

09 805813

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1996年 3月25日

出願番号

Application Number:

平成 8年特許願第068809号

出願人

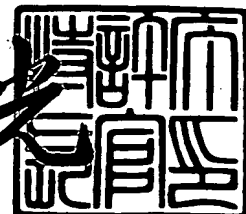
Applicant (s):

農林水産省農業生物資源研究所長

1996年 9月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平08-3067026

【書類名】 特許願

【整理番号】 H030501

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成 8年 3月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 組換え植物におけるタンパク質の生産方法

【請求項の数】 22

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省 農業  
生物資源研究所内

【氏名】 光原 一朗

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省 農業  
生物資源研究所内

【氏名】 大島 正弘

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県又丸729 岐阜県農業総合センター内

【氏名】 松古 浩樹

【発明者】

【住所又は居所】 青森県野木字山口221-10 青森県グリーンバイオ  
センター内

【氏名】 松川 佳澄

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県北相馬郡利根町布川2208-19

【氏名】 名取 俊二

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省 農業

生物資源研究所内

【氏名】 大橋 祐子

【特許出願人】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2

【氏名又は名称】 農林水産省農業生物資源研究所長 中川原 捷洋

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 888888

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組換え植物におけるタンパク質の生産方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子。

【請求項2】 前記植物遺伝子がタバコPR1aタンパク質をコードする遺伝子である請求項1に記載の組換え遺伝子。

【請求項3】 前記外来遺伝子が植物タンパク質のシグナル配列と結合している請求項2に記載の組換え遺伝子。

【請求項4】 前記外来遺伝子が双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子である請求項3に記載の組換え遺伝子。

【請求項5】 前記外双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドがSarcotoxin 1aである請求項1に記載の組換え遺伝子。

【請求項6】 請求項1から5いずれかの項に記載の組換え遺伝子が、植物遺伝子プロモーターと結合している発現カセット。

【請求項7】 前記植物遺伝子プロモーターが誘導性のタバコPR1a遺伝子のプロモーターである、請求項6に記載の発現カセット。

【請求項8】 さらに、タバコPR1a遺伝子由来のターミネーターを有する、請求項7に記載の発現カセット。

【請求項9】 請求項6ないし8いずれかの項に記載の発現カセットを植物に導入する発現ベクター。

【請求項10】 さらにT-DNA領域と薬剤耐性遺伝子とを有する、請求項9に記載の発現ベクター。

【請求項11】 前記薬剤耐性遺伝子がカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターで発現される、請求項9または10に記載の発現ベクター。

【請求項12】 前記薬剤耐性遺伝子を発現させるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターによって、外来遺伝子を発現させる誘導性のプロモーターが構成的に発現され、かつ、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって、該誘導性のプロモーターの活性を増大させる請求項11に記載の発

現ベクター。

【請求項13】 請求項1ないし5のいずれかの項に記載の組換え遺伝子で形質転換された植物。

【請求項14】 請求項6ないし8のいずれかの項に記載の発現カセットで形質転換された植物。

【請求項15】 請求項9ないし12のいずれかの項に記載の発現ベクターで形質転換された植物。

【請求項16】 以下の工程：

(1) 請求項1から5いずれかの項に記載の組換え遺伝子、請求項6ないし8のいずれかの項に記載の発現カセット、あるいは該発現カセットと構成的に発現する植物プロモーターに連結された薬剤耐性遺伝子とを有する遺伝子からなる群から選択される外来遺伝子を有する遺伝子で形質転換された植物細胞を取得する工程；

(2) 該形質転換された植物細胞を誘導条件下で培養する工程；および、

(3) 該外来遺伝子にコードされるペプチドを回収する工程；

を含む、該外来遺伝子にコードされるペプチドを製造する方法。

【請求項17】 前記外来遺伝子が誘導性のタバコPR1aプロモーターに連結された、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記構成的に発現する植物プロモーターがカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターである、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 前記薬剤耐性遺伝子を発現させるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターによって、外来遺伝子を発現させる誘導性のプロモーターが構成的に発現され、かつ、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって、該誘導性のプロモーターの活性を増大させる請求項18に記載の方法。

【請求項20】 抗菌性ペプチドをコードする遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子、該組換え遺伝子と植物遺伝子プロモーターとが結合している発現カセット、あるいは該発現カセットと構成的に発現する植物プロモーターに連結された薬剤耐性遺伝子とを有す

る遺伝子からなる群から選択される遺伝子を有する、病原細菌に抵抗性を有する植物。

【請求項21】 前記病原細菌が野火病菌あるいは軟腐病菌である、請求項20に記載の植物。

【請求項22】 前記抗菌性ペプチドが双翅目昆虫由来のSarcotoxin1aである請求項20に記載の植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は植物中で外来の有用タンパク質を効率的に生産させる方法に関する。また、本願発明は外来タンパク質を発現させ植物に新たな形質を付与する方法に関し、植物の育種に関する。

【0002】

【従来技術】

従来、植物細胞の核内に外来遺伝子を導入した場合、外来遺伝子産物であるペプチド発現量は多い場合で総タンパク質の0.1~0.3%であることが報告されている。特に、外来遺伝子による産物が分子量7,000以下の小さいペプチド(以下ショートペプチドという)である場合は、植物内で分解される可能性が高く大量に蓄積させることが非常に困難である。従って、植物内で、ショートペプチドを効率よく発現させる方法が望まれている。

【0003】

植物に外来遺伝子を導入し発現させる場合、ほとんどの場合はCaMV35Sプロモーターのような、常に発現している(構成的な)プロモーターを用いている。しかしこの発現方法は、少なくとも植物のタンパク質生産能力に負担となる可能性があるうえに、発現するタンパク質が植物に悪影響を与える事も考えられる。実際に植物ホルモン合成に関与する遺伝子のような、植物の育成に影響を与えるようなタンパク質を生産させる試みは失敗に終わることが多い。このような影響は特に植物に導入したタンパク質の生産量を多くしようとするほど深刻になると考えられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは；

(1) 外来タンパク質(ペプチド)を他のタンパク質との融合タンパク質として植物に発現させることによって、目的の外来タンパク質の植物体内での安定性を高めること；

(2) 上記融合タンパク質をコードする組換え遺伝子を構成的に一定レベルの発現させ、なおかつ誘導的に発現量の増大するような発現カセットまたはこの発現カセットを含む発現ベクターを提供し、外来タンパク質の植物内での生産量を増大させること；

(3) 誘導条件下で、一旦融合タンパク質として発現されるタンパク質をその融合部分で切断しそれぞれの遊離型タンパク質として生産させること；および

(4) 上記の発現カセットまたは発現ベクターを用いて形質転換された植物を提供すること；および、

(5) 外来タンパク質として、病原菌耐性のタンパク質を用いることにより、病原菌に対して抵抗性のある植物を提供すること；  
にある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本願発明は外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子に関する。

【0006】

好適な実施態様においては、前記植物遺伝子がタバコPR1aタンパク質をコードする遺伝子である。

【0007】

好適な実施態様においては、前記外来遺伝子が植物タンパク質のシグナル配列と結合している。

【0008】

好適な実施態様においては、前記外来遺伝子が双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチ

ドをコードする遺伝子であり、さらに好適にはSarcotoxin1 aをコードする遺伝子である。

【0009】

本願発明はさらに、植物遺伝子プロモーターと前記組換え遺伝子とを含有する発現カセットに関する。

【0010】

好適な実施態様においては、前記植物遺伝子プロモーターが誘導性のタバコPR1 a遺伝子のプロモーターである。

【0011】

好適な実施態様においては、発現カセットはタバコPR1 a遺伝子由来のターミネーターを有する。

【0012】

好適な実施態様においては、前記外来遺伝子が植物タンパク質のシグナル配列と結合している発現カセットである。

【0013】

また、本願発明は上記発現カセットを植物に導入する発現ベクターに関する。

【0014】

好適な実施態様においては、前記発現ベクターは、さらにT-DNA領域と薬剤耐性遺伝子とを有する。

【0015】

好適な実施態様においては、前記薬剤耐性遺伝子を発現させるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターによって、外来遺伝子を発現させる誘導性のプロモーターが構成的に発現され、かつ、サリチル酸あるいは病原体感染（例えばタバコモザイクウイルス感染）に伴う壊死病斑形成によって、該誘導性のプロモーターの活性を増大させる。

【0016】

また、本願発明は、前記組換え遺伝子、前記発現カセットあるいは前記発現ベクターで形質転換された植物に関する。



【0017】

さらに、本願発明は、以下の工程：

(1) 前記組換え遺伝子、発現カセット、あるいは該発現カセットと構成的に発現する植物プロモーターに連結された薬剤耐性遺伝子とを有する遺伝子からなる群から選択される外来遺伝子を有する遺伝子で形質転換された植物細胞を取得する工程；

(2) 該形質転換された植物細胞を誘導条件下で培養する工程；および、

(3) 該外来遺伝子にコードされるペプチドを回収する工程；

を含む、該外来遺伝子にコードされるペプチドを製造する方法に関する。

【0018】

好適な実施態様においては、前記薬剤耐性遺伝子を構成的に発現させる植物プロモーターがカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターであり、このカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターによって、外来遺伝子を発現させる誘導性のプロモーターが構成的に発現され、かつ、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって、病原細菌に抵抗性を有する植物外来遺伝子の発現量を増大させる。

【0019】

また、本発明は、病原細菌に抵抗性を有する植物に関し、この病原細菌に抵抗性を有する植物は、抗菌性ペプチドをコードする遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子、該組換え遺伝子と植物遺伝子プロモーターとが結合している発現カセット、あるいは該発現カセットと構成的に発現する植物プロモーターに連結された薬剤耐性遺伝子とを有する遺伝子からなる群から選択される遺伝子を有する。

【0020】

好適な実施態様においては、前記形質転換された植物は、野火病菌あるいは軟腐病菌に対して耐性である。

【0021】

好適な実施態様においては、前記抗菌性ペプチドが双翅目昆虫由来のSarcotoxin 1aである。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0023】

本願発明は、外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子、植物遺伝子プロモーターと組換え遺伝子とが結合した発現カセット、この発現カセットを植物に導入する発現ベクターに関する。

【0024】

本願明細書で使用する用語「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。特に好ましい植物として、タバコ、柑橘類、白菜、レタス、モモ、イネ、ジャガイモ、トマト、オオムギ、コムギおよびリンゴが挙げられる。

【0025】

本願明細書で使用する用語「植物遺伝子プロモーター」は、植物で発現する公知のプロモーターを意味する。例えば、タバコの感染特異的タンパク質PR1aのプロモーター（以下、タバコPR1aプロモーターという）などのある種のストレスにより発現が誘導されるプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下、CaMV35Sプロモーターという）、ノパリン合成酵素のプロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない。高発現のためにはエンハンサーが用いられ得る。エンハンサーとしては、上記35Sプロモーター上流の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは複数個用いられ得る。

【0026】

本願明細書で使用する用語「植物遺伝子」は、植物が有する遺伝子を意味する。植物遺伝子としては、いずれの遺伝子も使用され得る。好適にはタバコの感染特異的タンパク質PR1a遺伝子が挙げられるが、これに限定されない。

【0027】

本願明細書で使用する用語「タバコキチナーゼのhinge領域」とは、タバコのキチナーゼタンパク質中で異なる機能領域(キチン結合領域と触媒領域)を隔てている領域をいう。(H.Shinshi ら、Plant Mole. Biol. 14巻、357-368(1990)。

植物遺伝子と外来遺伝子との連結部分にタバコキチナーゼのhinge領域が存在することにより、各々のタンパク質の立体障害を避け得ることが期待される。

【0028】

本願明細書で使用する用語「外来遺伝子」とは、宿主植物にとって異種のタンパク質をコードする遺伝子をいう。植物遺伝子、バクテリア、酵母などの微生物の遺伝子、昆虫の遺伝子、動物の遺伝子などが好適に用いられ得る。病原耐性植物を育種する場合等には、抗菌性ペプチドが外来性遺伝子として用いられ得る。

【0029】

例えば、双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドをコードする遺伝子をいうが、これに限定されない。双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドとしては、センチニクバエに由来するザルコトキシシン1A、ザーペシン、または抗真菌タンパクが好ましいが、これらに限定されない。発現カセットに導入する外来遺伝子にはシグナル配列が付加され得、これにより生じる融合タンパク質は分泌され得る。

【0030】

本願発明の、外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子の作成には、公知の遺伝子組換え技術が使用され得る。

【0031】

本願明細書で使用する用語「発現カセット」とは、上記組換え遺伝子が発現し得るように、上記組換え遺伝子とその発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。発現カセットは常法に従って構築され得る。適切なプロモーター、例えば、タバコPR1aプロモーターを、上記組換え遺伝子に結合させる。タバコPR1aプロモーターは、誘導性でかつ発現量の高いプロモーターとして知られている。さらに好適には、ターミネーターを上記組換え遺伝子に結合させ得る。

【0032】

本願明細書で使用する用語「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺

伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター、タバコPR1a遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに限定されない。タバコのPR1a遺伝子のターミネーターは遺伝子の発現効率を高めることが確認されている。

【0033】

本願明細書で使用する用語「発現ベクター」とは、上記発現カセットを宿主細胞中に伝達する媒体をいう。発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。本願発明の発現ベクターはさらにT-DNA領域と薬剤耐性遺伝子とを有し得る。

【0034】

薬剤耐性遺伝子としては、形質転換植物の選抜が容易であることが望ましい。薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシンフォスフォトランスフェレース (NPT) 遺伝子、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェレース遺伝子等が好適に用いられ得る。

【0035】

薬剤耐性遺伝子を発現させるプロモーターとしては、上記植物遺伝子プロモーター、例えばタバコPR1aプロモーター、CaMV35Sプロモーター、ノパリン合成プロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない。好適には、構成的に高発現するCaMV35Sプロモーターが使用され得る。上記発現カセットに外来遺伝子を発現させるプロモーターとして誘導性のタバコPR1aプロモーターを用いると、このCaMV35Sプロモーターによって、この誘導性のPR1aプロモーターが構成的に発現され、かつ、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって、PR1aプロモーター発現量が増大される。これは、CaMV35SプロモーターとPR1aプロモーターとが隣り合って存在するため、PR1aプロモーターの性質が35Sプロモーター上にあるシスエレメントの影響を受けるからと考えられる。

【0036】

発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、pBI系のベクター、pUC系のベ

クターあるいはpTRA系のベクターが好適に用いられ得る。pBI系のベクターはバイナリーベクター系あるいは中間ベクター系のようなアグロバクテリウムを介して植物に発現カセットを導入し得る。例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3等が挙げられる。pUC系のベクターは、直接植物に発現カセットを導入し得る。例えば、pUC18、pUC19、pUC9などが挙げられる。本願では、pTRA系 (Ohshima et al, Plant Cell 2巻、95-106頁(1990)) のバイナリーベクターが好適に用いられ得る。この発現ベクターは、植物に導入されうる領域(T-領域)に融合遺伝子を含む発現カセットと、マーカー遺伝子としてCaMV35Sプロモーターの支配下で発現されるNPT遺伝子を含んでいる。

【0037】

本願発明の発現ベクターがT-領域を有する場合、そのT-領域構造に：

(1) アグロバクテリウムから植物に移行する際に、導入を意図する外来遺伝子が先に移行し、続いてマーカー遺伝子が移行する様にT-領域の右側に外来遺伝子を含む発現カセットが配置され得る。このため薬剤耐性によって選抜された形質転換植物は極めて高い確率で外来遺伝子を含み得る、および

(2) マーカー遺伝子の発現を支配するCaMV35Sプロモーターと外来遺伝子の発現を支配するPR1a遺伝子のプロモーターを隣り合わせに配置してある。このことにより、本来PR1aプロモーターを用いて外来遺伝子を植物に発現させた場合非誘導条件下では発現が殆ど見られないが、おそらくCaMV35Sプロモーターの影響により非誘導状態でも構成的な発現を示し、なおかつ誘導により高いレベルの発現を示すようになる、という特徴を有する。

【0038】

上記発現ベクターは、PR1aプロモーターを用いると、サリチル酸あるいは病原体感染に伴う壊死病斑形成によって誘導的に発現量が増大する。

【0039】

本願発明の発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作成され得る。

【0040】

植物細胞への組換え遺伝子、発現カセット、あるいは発現ベクターの導入、エ

レクトロポレーションによって当業者に周知の方法が用いられ得る。

【0041】

上記得られた発現カセット、あるいは発現ベクターを細胞に導入するには、上記のようにアグロバクテリウムを介する方法と直接細胞に導入する方法とがある。

【0042】

アグロバクテリウムを介する方法は、例えば、Nagelらの方法(Micribiol. Lett., 67, 325(1990))が用いられ得る。この方法は、まず、例えば発現ベクターをエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムに形質転換し、ついで、形質転換されたアグロバクテリウムをPlant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin et al., Academic Press Publishers) に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。発現カセット、発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法がある。

【0043】

発現カセット、発現ベクターを導入された細胞は、まずカナマイシン耐性等の薬剤耐性で選択され、ついで、常法により、植物体に再生され得る。

【0044】

形質転換された植物における外来遺伝子の発現の確認には、当業者に周知の方法が用いられ得る。例えば、形質転換された植物から可溶性のタンパク質を抽出し、Analytical Biochemistry 166, 368-379に記載のように、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で抽出した蛋白質を分離し、PVDF膜に転写した後、目的の蛋白質に対する抗体と反応させ、生じるバンドを免疫化学的に検出する事によって、発現が確認され得る。

【0045】

病原菌抵抗性の測定は、植物体に再生された形質転換植物およびコントロール植物の葉に病原菌を細針束を用いて接種し、適当な時間、例えば6日後に壊死病斑の大きさおよび葉色の変化により病徴の程度を判定する。病原菌としては、野火病菌(*P. syringae* pv. *tabaci*)、軟腐病菌(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)などが挙げられる。

【0046】

本願発明の一態様として、植物遺伝子としてタバコPR1aタンパク質遺伝子を、外来遺伝子として双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドであるSarcotoxin1aの遺伝子をそれぞれ用いて、タバコキチナーゼのhinge領域を介して連結させたものについて説明する。

【0047】

Sarcotoxin 1aは細菌類に広く抗菌性を示すペプチドであり本ペプチドをタバコに導入することにより、病原菌に対して一定の抵抗性を示す植物が得られることがすでに確かめられている(特開平7-250685)。しかしながら、このSarcotoxin 1aの様な短いペプチドは植物体内では不安定であることが予想されるため、タバコの持つ感染特異的タンパク質であるPR1aとの融合タンパク質として生産させることにより安定化させることが期待される。タバコキチナーゼのhinge領域は、タバコのキチナーゼタンパク質中で異なる機能領域(キチン結合領域と触媒領域)を隔てている領域である。タバコPR1aタンパク質とSarcotoxinとの連結部分にタバコキチナーゼのhinge領域を挿入することにより、各々のタンパク質の立体障害が避けられ得る。また、融合タンパク質のN末端にはタバコPR1aタンパク質のシグナル配列が付加されておりこれにより、融合タンパク質は分泌され得る。病原菌に対する抗菌性が向上することが見込まれるが、これは、融合タンパク質が細胞間隙に分泌される結果、植物細胞に対する損傷を防ぎ、さらに細胞間隙から侵入してくる病原菌を防ぐからであろう。

【0048】

【実施例】

以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。この実施例で使用した制限酵素、プラスミド等は宝酒造株式会社、東洋紡績株式会社等から入手可能である。

【0049】

(実施例1 組換え遺伝子および発現カセットの作成)

外来遺伝子と植物遺伝子とがタバコキチナーゼのhinge領域を介して結合している組換え遺伝子を以下のように作成した。図1に基づいて説明する。

【0050】

(1) P+S PR1a断片 (PR1aプロモーターの一部とPR1a蛋白質のシグナルペプチドをコードする配列を有するDNA断片) の調製

図1に示すタバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- $\gamma$  (M. Oshimaら、FEBS Letters 255巻、243-246頁(1987)) を鋳型として、PR1aプロモーター領域にあるXhoI部位からシグナルペプチドをコードしている領域までを増幅し、DNA断片 (P+S PR1a断片) を得た。P+S PR1a断片は、配列番号1の配列を有するプライマーPPR1a51と配列番号2の配列を有するプライマーSPR1a31とをプライマーとして、Pfuポリメラーゼ (stratagene社製) を用いてPCRで得られた断片である。このPCRに用いたプライマーのうちSPR1a31はPR1a遺伝子のシグナルペプチドをコードする配列と相補的な配列を有しているが、図2に示すように、塩基が一部置換されている。この塩基の置換により制限酵素部位PstIが新たに導入されたが、コードするアミノ酸配列には変化がない。

【0051】

(2) TPR1a断片 (PR1a遺伝子のターミネーター領域を有するDNA断片) の調製

図1のタバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- $\gamma$  を鋳型として、PR1a遺伝子のターミネーター領域を有するDNA断片 (TPR1a断片) を得た。TPR1a断片は、配列番号3のプライマーTPR1a51および配列番号4のプライマーBKSBEを用いて、PR1aのターミネーター領域をPCRで増幅して得られたDNA断片である。このPCRに用いたプライマーのうち、TPR1a51は5' 端にSarcotoxin 1aをコードするcDNAの3' 端と相同な配列を有し、さらにその終止コドンの直後にSacIの認識配列を有する。また、終止コドン直前に、図3に示すように塩基が一部置換されている。この塩基の置換により制限酵素認識部位PmaCIが新たに導入されたが、コードするアミノ酸配列には変化がない。他方、プライマーBKSBEは、pPR- $\gamma$  のベクター部分のEcoII部位からBamHI部位までと相同な配列を持つ。この部位はpPR- $\gamma$  のPR1a遺伝子のターミネーターに相当する部分の3' 端と隣接している。



【0052】

(3) HMPR1a断片 (タバコのキチナーゼのhinge領域およびPR1aの成熟型タンパク質をコードする領域を有するDNA断片)の調製

図1のタバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR- $\gamma$ を鋳型として、PR1aの成熟型タンパク質をコードする領域を有するDNA断片(H MPR1a断片)を得た。H MPR1a断片は、配列番号5のプライマーHMPR1a51および配列番号6のプライマーMPR1a31を用いて、PCRにより増幅された断片である。このPCRに用いたプライマーのうち、HMPR1a51は5' 端にTPR1a51のPmaCI部位およびその周辺の12塩基の配列と同一の配列を含み、さらにその3' 側にタバコのキチナーゼのhinge領域をコードする領域と同一の配列を有する。

【0053】

また、MPR1a31は3' 側の終止コドン直後に、制限酵素SacIの認識部位が付加されている。

【0054】

(4) MSARCO断片 (Sarcotoxinの成熟型ペプチドをコードする領域を有するDNA断片)の調製

Sarcotoxin1AのcDNAを含む既知のプラスミドpT019(N. Matsumoto et al., Bio Chem. J., 239, 717(1986))を鋳型として、Sarcotoxinの成熟型ペプチドをコードする領域を有するDNA断片(MSARCO断片)を得た。このMSARCO断片は、配列番号7のプライマーMSARCO51および配列番号8のプライマーMSARCO31を用いてSarcotoxinの成熟型ペプチドをコードする領域をPCRにより増幅して得られたDNA断片である。プライマーMSARCO51およびMSARCO31の配列をそれぞれ図4および図5に示す。プライマーMSARCO51は5' 端付近にSPR1a31のPstI部位およびその周辺の14塩基と相補的な配列を持つ。MSARCO31は、図5に示すように終止コドンにコードする領域と相補的な配列周辺に制限酵素PmaCIおよびSacIの認識部位が導入されている。この制限酵素部位の導入は、TPR1a51と同様にして行った。

【0055】

(5) MSARCO-TPR断片 (MSARCO断片とTPR1a断片とを連結したDNA断片)の調製  
上記(4)で得られたMSARCO DNA断片と(2)で得られたTPR1a断片とを鋳型と

してプライマーMSARCO31およびBKSBEを用いる組換えPCR法により増幅し、MSARCO-TPR断片を得た。

【0056】

(6) 組換え遺伝子の調製 (P+S PR1a断片、H MPR1a断片およびMSARCO-TPR1a断片の接続)

上記(1)で得られたP+S PR1a断片、(3)で得られたH MPR1a断片および(5)で得られた(2)と(4)との結合断片であるMSARCO-TPR1a断片を、それぞれ、プラスミドpUC18にクローニングし、それぞれ、pUC P+S PR1a、pUC H MPR1aおよびpUC MSARCO-TPR1aと命名した(図6を参照)。これらのプラスミドに目的の配列が正しく挿入されていることを、アプライドバイオシステム社製の塩基配列決定kitおよび塩基配列解析装置を用いて確認した。これらの、pUC18にクローニングされ塩基配列を確認したDNAを以後の遺伝子組換えの材料として用いた。配列番号7に、配列決定されたPR1aのターミネーター部分の塩基配列を示す。

【0057】

以下、図6を参照しながら本願発明の組換え遺伝子の作成を説明する。

【0058】

まず、プラスミドpPR- $\gamma$ のPR1a遺伝子のプロモーター領域のXhoI部位より上流(5'側)部分を制限酵素EcoRIおよびXhoIで切断し、得られた約1.6kbの断片をBio101社製のGene Clean kitで精製した。他方、P+S PR1a断片をクローニングしたプラスミドpUC P+S PR1aをEcoRI-XhoIで切断し、その切断部位に、上記精製した約1.6kbの断片を挿入した。得られたプラスミド(pUC P+S PR(2.4))はインサートとして全長のPR1a遺伝子プロモーターおよびPR1a遺伝子のシグナル配列をコードするDNA領域を含む。このプラスミドはEcoRIで切り出される、タバコPR1aプロモーターのカセットを有している。

【0059】

pUC MSARCO-TPR1aを制限酵素PstIで切断し、MSARCO-TPR1aに相当するDNA断片を精製した。この断片を、pUC P+S PR(2.4)のPstI部位に挿入した。得られたプラスミドのうち挿入されたDNA配列が正しくP+S PR1a-MSARCO-TPR1aの方向に挿入されているプラスミド(pUC P+S PR(2.4) MSARCO-TPR1a)を選択した。このプラ

スミドは、EcoRIで切り出される、タバコPR1aプロモーターによって支配される、発現可能な非融合Sarcotoxinをコードする遺伝子のカセットを有している。

#### 【0060】

ついで、プラスミドpUC H MPR1aからH MPR1a部分を制限酵素PmaCI, SacIにより切り出した。他方、pUC P+S PR(2.4) MSARCO-TPR1aをPmaCI-SacIで切断し、その部位に切り出したH MPR1a部分を挿入した(pUC P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR)。このプラスミドは、外来遺伝子として双翅目昆虫由来の抗菌性ペプチドであるSarcotoxin1aの遺伝子と、植物遺伝子としてタバコPR1aタンパク質遺伝子とを、タバコキチナーゼのhinge領域を介して連結させた本願発明の組換え遺伝子を含む。さらに、このプラスミドは、タバコPR1aプロモーターによって支配されるSarcotoxin1a-PR1a融合タンパク質をコードする組換え遺伝子を有しており、このプラスミドを、EcoRIで切断すると、タバコPR1aプロモーターによって支配される発現可能なSarcotoxin1a-hinge-PR1a融合タンパク質をコードする組換え遺伝子、P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR、つまり、本願発明の組換え遺伝子を発現する発現カセットを有している。

#### 【0061】

##### (実施例2 発現ベクターの構築)

バイナリーベクターpTRA415 (図7) (Ohshima et al, Plant Cell 2巻、95-106頁(1990)) は、BglIII-BglIII断片内に、CaMV35Sプロモーターの下流にNPT遺伝子が結合した配列を有する。このpTRA415をBglIIIで切断し、ライゲース (ligase) によって再連結した後、大腸菌JM109に導入した。形質転換株の中から、pTRA415のBglIII-BglIII断片が逆の方向に挿入されたプラスミド(pTRA415(R))を選抜した。pTRA415(R)はT-領域内部にマーカー遺伝子としてCaMV35Sプロモーターで支配されるNPT遺伝子を有し、その右側にpTRA415(R)内で一箇所だけ切断する(ユニークな)制限酵素切断部位として、EcoRI部位を持つ。このEcoRI部位に外来遺伝子を導入した場合、この外来遺伝子が植物に移行した後にマーカー遺伝子が移行される。

#### 【0062】

上記プラスミドpUC P+S PR1a(2.4) MSARCO TPR (非融合Sarcotoxinを発現する

プラスミド)をEcoRIで切断し、P+S PR1a(2.4) MSARCO TPR断片を切り出し、pTRA415(R)のEcoRI部位に挿入した。得られたプラスミドから、挿入された発現カセットのPR1aプロモーターがマーカ遺伝子のCaMV35Sプロモーターと隣接するように挿入されているものを選抜した(プラスミドPSS)。

【0063】

同様に、プラスミドpUC P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR (融合Sarcotoxin-PR1aタンパク質を発現するプラスミド)をEcoRIで切断し、P+S PR1a(2.4) MSARCO H MPR1a TPR断片を切り出し、pTRA415(R)のEcoRI部位に挿入した。得られたプラスミドから、挿入された発現カセットのPR1aプロモーターがマーカ遺伝子のCaMV35Sプロモーターと隣接するように挿入されているものを選抜した(プラスミドPSP)。

【0064】

(実施例3 発現カセットのタバコへの導入)

(*Agrobacterium tumefaciens*の形質転換)

*Agrobacterium tumefaciens*を250  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンと50  $\mu$ g/mlのリファンピシンを含む培地中、28℃で培養しNagelら(Micribiol. Lett., 67, 325(1990))の方法に従って、細胞培養液を調整し、発現ベクター(プラスミドPSP)をエレクトロポレーションにより上記細菌に導入した。同様にして、プラスミドPSS(これは非融合Sarcotoxinを発現するベクターである)、および特開平7-250685に記載のプラスミドPST10(これは、構成的に非融合Sarcotoxinを発現するベクターである)を上記細菌に導入した。本願発明に用いたPSP、PSSおよびPST10の各プラスミドの模式図を図8に示す。

【0065】

(タバコの形質転換)

上記方法でプラスミドPSPで形質転換された*Agrobacterium*を得、YEB培地(DNA cloning第2巻78頁)で振とう培養した後、滅菌水で20倍に希釈し、タバコ(*Nicotiana tabacum* Samsun NN)の葉片を共存培養した。2~3日後、抗生物質を含む培地で上記細菌を除去し、2週間ごとに選択培地で継代し、形質転換したタバコ細胞を選抜し、定法により再分化した結果29個体の独立した形質転換個体を得た

【0066】

同様に、プラスミドPSSあるいはプラスミドPST10で形質転換された形質転換個体を得た。

【0067】

(実施例4 形質転換植物における融合タンパク質のウェスタンブロッティングによる検出)

得られたPSPで形質転換された形質転換植物、プラスミドPST10で形質転換された植物、および野生型のSamsun NN植物からそれぞれ可溶性のタンパク質抽出液を調製した。それぞれのタバコの葉から直径約7mmの葉片4枚を切り取りサリチル酸0.5mM水溶液上に、および対象として純水上に、浮遊させた状態で2日間培養した後、20 $\mu$ lの50mM Na-PO<sub>4</sub> (pH7.0), 1mM Na-EDTA, 10 $\mu$ M A-PMSF, 0.5 $\mu$ g/ml Leupeptin, 2mM DTT中ですりつぶし、10,000rpmで10分間遠心を行い上清を回収しタンパク質抽出液とした。この抽出液のうち2.5 $\mu$ lをAnalytical Biochemistry 166, 368-379で示されているSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF膜に転写した後、抗Sarcotoxin抗体と反応するバンドを免疫化学的に検出した。図9にウェスタンブロッティングの結果を示す。

【0068】

融合遺伝子を導入した植物(PSP植物)では、サリチル酸処理の有無に関わらず融合タンパク質と思われるバンドが検出された。ただし、検出される融合タンパク質の量は、サリチル酸による誘導により著しく増加した。また、サリチル酸処理により遊離型(融合していない)Sarcotoxinと思われるバンドが見られるようになった。Samsun NN植物では抗Sarcotoxin抗体に反応するバンドは検出されないが、PST10植物ではSarcotoxinに由来すると思われるバンドが検出され、これはPSP植物の低分子側に現れるバンドと一致した。同様の実験を抗Sarcotoxin抗体にかえて抗PR1a抗体でも行った。その結果PSP植物で見られる高分子側のバンドは抗PR1a抗体でも認識されることが確認されて、この高分子側のバンドが融合タンパク質であることが確認された。

【0069】

(実施例5 融合遺伝子を導入した形質転換植物の野火病菌抵抗性の検定)

形質転換タバコおよびコントロール植物の葉に細針を用いて4カ所傷を付け、野火病菌(*P. syringae* pv. *tabaci*)の懸濁液 $2 \times 10^7$  mlを接種した。同様の処理を1系統の植物に対し4回行った。6日後に壊死病斑の大きさおよび葉色の変化により病徴の程度を判定した。

【0070】

壊死病斑の評価を以下の数字で表した。

【0071】

- 0 壊死部位は認められない
- 1 壊死部位の直径が3 mm以下
- 2 壊死部位の直径が5 mm以下
- 3 壊死部位の直径が10 mm以下
- 4 壊死部位の直径が10 mm以上

黄化部位の評価を以下の数字で表した。

【0072】

- 0 黄化部位は認められない
- 1 直径が5 mm程度の淡い黄化部位あり
- 2 直径が5 mmを越える黄化部位あり
- 3 直径が10 mm以上の黄化部位あり

接種部位が黄化に伴い壊死部が拡大

この結果を図10に示す。融合遺伝子が導入されたタバコのうちいくつかの個体がコントロール植物と比べ野火病菌による病徴の軽減が認められた。

【0073】

本願発明の発現カセットを用いることにより、sarcotoxinを単独で発現させるよりも抵抗性が強化されていることがわかる。

【0074】

(実施例6 融合遺伝子を導入した形質転換植物の軟腐病菌抵抗性の検定)

形質転換タバコおよびコントロール植物の葉から直径7 mmの葉片を切り出し、

軟腐病菌(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)の懸濁液 $4 \times 10^7$  ml、および対象として純水上に浮遊させた。1系統の植物に対し4枚の葉片を実験に用いた。3日後に病徴の程度を葉色の変化により、細菌の増殖を懸濁液の濁度の変化で、判定した。結果を図11に示す。

【0075】

この結果、コントロール植物と比べて融合遺伝子が導入されたタバコのうちいくつかの個体では軟腐病菌による病徴が軽減され、同時に軟腐病菌の増殖が抑えられていた。

【0076】

このことから本融合タンパク質の導入により野火病菌および軟腐病菌に抵抗性の植物が得られることが判明した。

【0077】

【発明の効果】

本発明の融合タンパク質を上記発現ベクターで植物に導入し発現させた結果、融合タンパク質を構成的に生産させ、さらにサリチル酸等の誘導によりその生産量を増大させることが出来た。加えて、サリチル酸・TMV感染により誘導される未同定のタンパク質分解活性により、融合タンパク質がその連結部分で切断された結果として、誘導的にそれぞれの遊離型タンパク質を生産させることができた。

【0078】

本発明の組換え遺伝子、発現カセットあるいは発現ベクターを用いることにより、外来タンパク質を融合タンパク質として構成的に生産させること、および誘導的にそれぞれの遊離型タンパク質を生産させることが出来る。本法により抗菌性ペプチドを植物遺伝子との融合タンパク質として発現させ、病原細菌抵抗性の植物を作出することが出来る。

【0079】

【配列表】

【0080】

【配列番号：1】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列

AGTAGAATTC TTAAAACACC CTCGAGGATT TC

32

【0081】

【配列番号：2】

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

GGGCTCTGCA GGAGTGGGAT ATT

23

【0082】

【配列番号：3】

配列の長さ：43

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

ACAGCACGTG GTTAATTGAG CTCGAAACGA CCTACGTCCA TTC

43

【0083】

【配列番号：4】

配列の長さ：21



配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TCCCCCGGGC TGCAGGAATT C

21

【0084】

【配列番号：5】

配列の長さ：72

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TACACACGTG GTCCCACACC TACACCCCCC ACCCCACCCG GTGGTGGGCA AAATTCTCAA

CAAGACTATT TG

72

【0085】

【配列番号：6】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TATCGAGCTC AATTAGTATG GACTTTCGCC

30

【0086】

【配列番号：7】

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

CACTCCTGCA GAGCCGGTTG GTTGAAAAAG ATTGGC

36

【0087】

【配列番号：8】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

配列：

TTTCGAGCTC AATTAACCAC GTGCTGTAGC AGC

33

【0088】

【配列番号：9】

配列の長さ：508

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タバコPR1aターミネーター

配列：

TTGAAACGAC CTACGTCCAT TTCACGTAA TATGTATGGA TTGTTCTGCT TGATATCAAG	60
AACTTAAATA ATTGCTCTAA AAAGCAACTT AAAGTCAAGT ATATAGTAAT AGTACTATAT	120
TTGTAATCCT CTGAAGTGGA TCTATAAAAA GACCAAGTGG TCATAATTAA GGGGAAAAAT	180
ATGAGTTGAT GATCAGCTTG ATGTATGATC TGATATTATT ATGAACAGCG TTTTGTACTC	240
ATACGAATCA TGTGTTGATG GTCTAGCTAC TTGCGATATT ACGAGCAAAA TTCTTAACTA	300
CATGCCTTAG GAACAAGCTT ACACAGTTCA TATAATCTAC TAGAGGGCCA AAAACATGAA	360
AATTACCAAT TTAGATGGTA GGAGGATATT GAAAGTGGAG CAGCTAGTTT TAATAACTGA	420
CCGTTAGTCT TAAAATTGAC GGTATAAAAA TATTACATA ATCAGGTCAT TTATAAGGTA	480
ATTATAGGTA AATATTTATG ACGAATTC	508

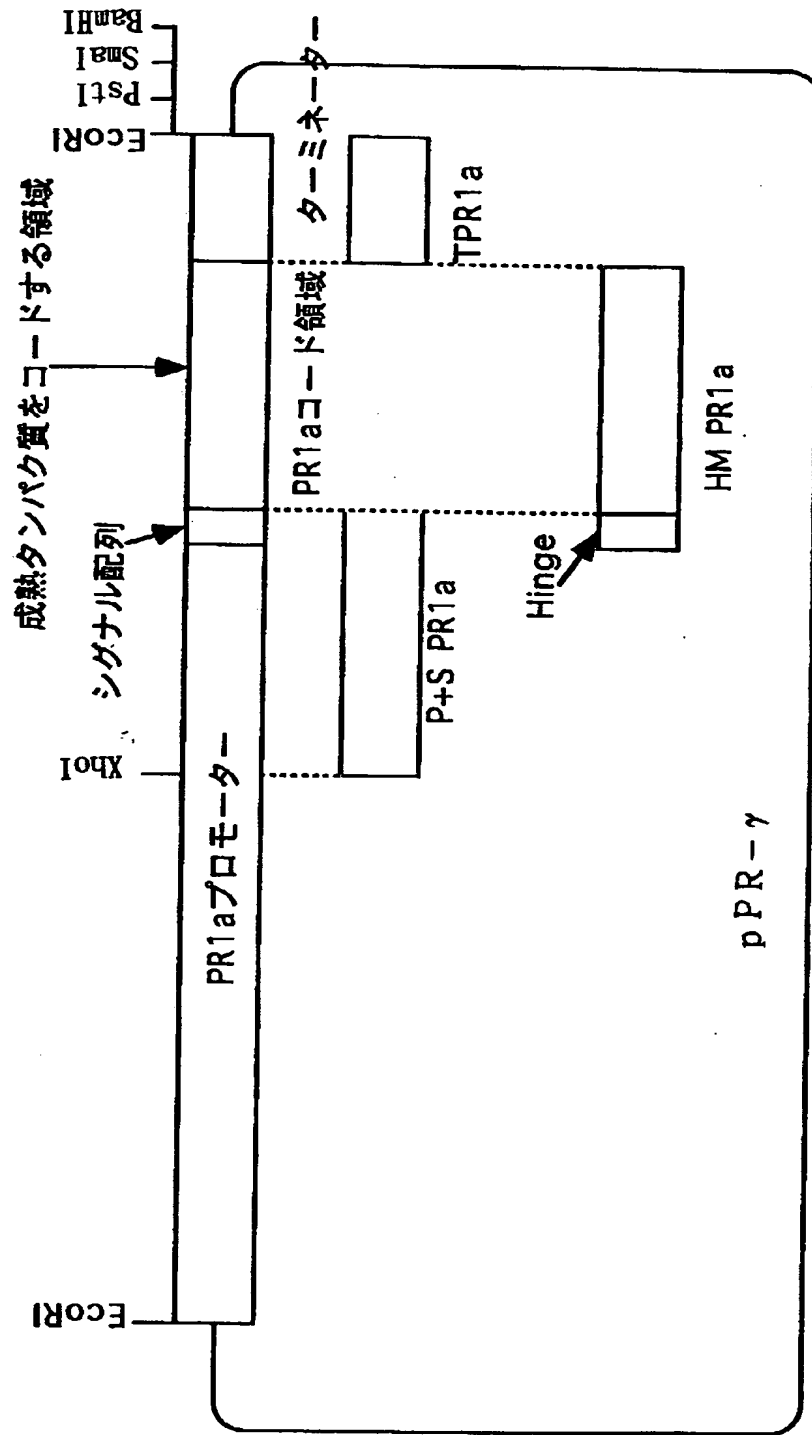
【図面の簡単な説明】

【図1】タバコPR1a遺伝子のゲノミッククローンを有するプラスミドpPR-γを示す図である。

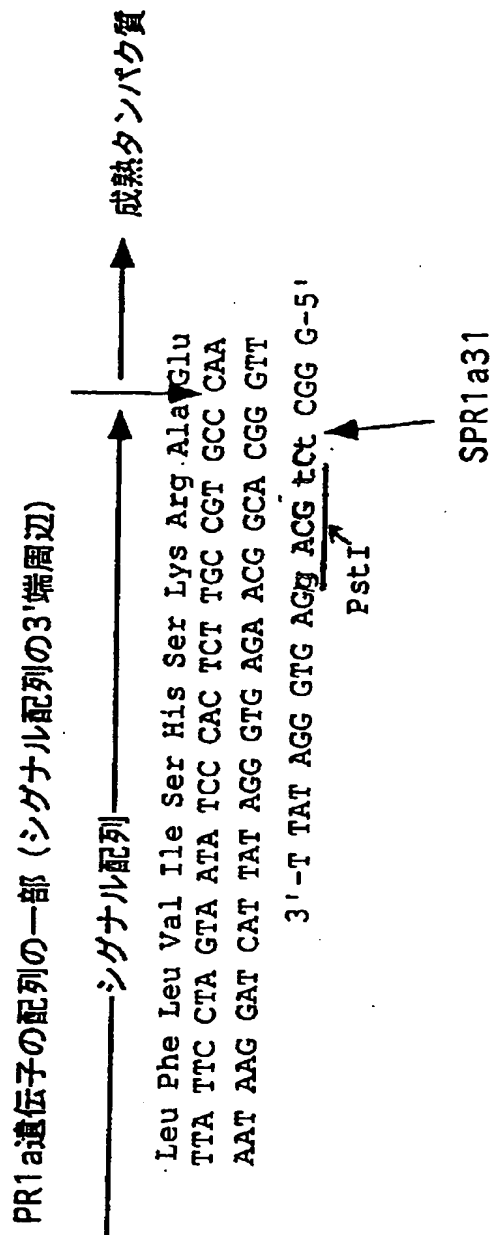
- 【図2】 プライマーSPR1a31の置換された配列を示す図である。
- 【図3】 プライマーTPR1a51の置換された配列を示す図である。
- 【図4】 プライマーMSARC051の配列を示す図である。
- 【図5】 プライマーMSARC031の置換された配列を示す図である。
- 【図6】 本願発明の組換え遺伝子の作成を説明する図である。
- 【図7】 バイナリーベクターpTRA415およびpTRA415(R)を示す図である。
- 【図8】 本願発明に用いた各プラスミドPSP、PSSおよびPST10を示す図である。
- 【図9】 PSPおよびPST10で形質転換された植物におけるSarcotoxinの発現を示す図である。
- 【図10】 形質転換された植物のタバコ野火病菌抵抗性を示す図である。
- 【図11】 形質転換された植物の軟腐病菌抵抗性を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



小文字の塩基が変異を導入した部分

【図3】

TPR1a51のプライマー配列

Sarcotoxin遺伝子の一部（成熟型ペプチドのC末端をコードする領域）

Ala Ala Thr Ala Arg Gly \*\*\*  
5'-GCT GCT ACA GCC AGA GGT TAA TTG AAA-3'

PR1a遺伝子の配列の一部（成熟型タンパク質のC末端をコードする領域）

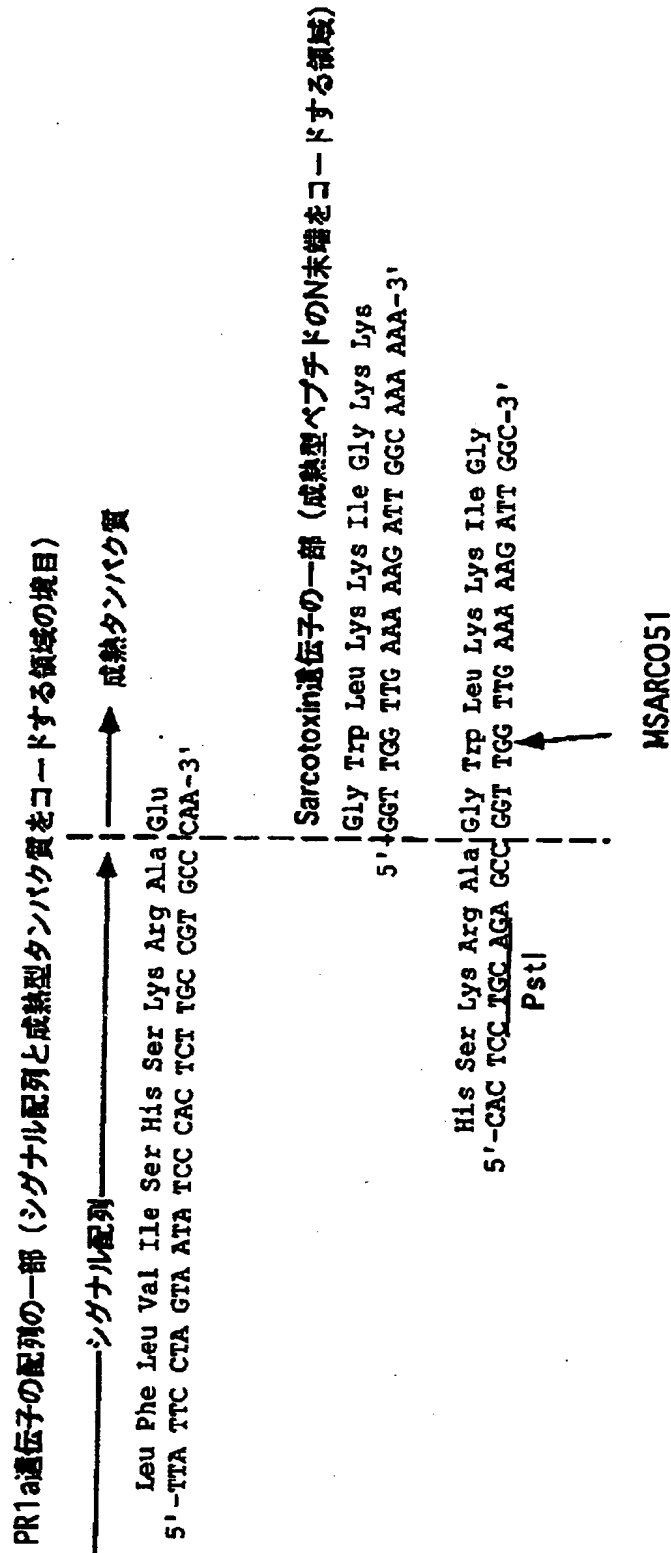
Pro Tyr \*\*\*  
5'-CCA TAC TAA TTG AAA CGA CCT ACG TCC ATT-3'

5'-GCT GCT ACA GCA CGT GGT TAA TTG AGC TCG AAA CGA CCT ACG TCC-3'  
PmaCI  
SacI

↑  
TPR1a51

【図4】

MSARCO51のプライマー配列



【図 5】

MSARCO31のプライマー配列

Sarcotoxin遺伝子の一部（成熟型ペプチドのC末端をコードする領域）

Ala Ala Thr Ala Arg Gly \*\*\*

5'-GCT GCT ACA GCC AGA GGT TAA TTG-3'

3'-CGA CGA TGT CGG TCT CCA ATT AAC-5'

3'-CGA CGA TGT CGT GCA CCA ATT AAC TCG AGC TTT-5'

PmaCI

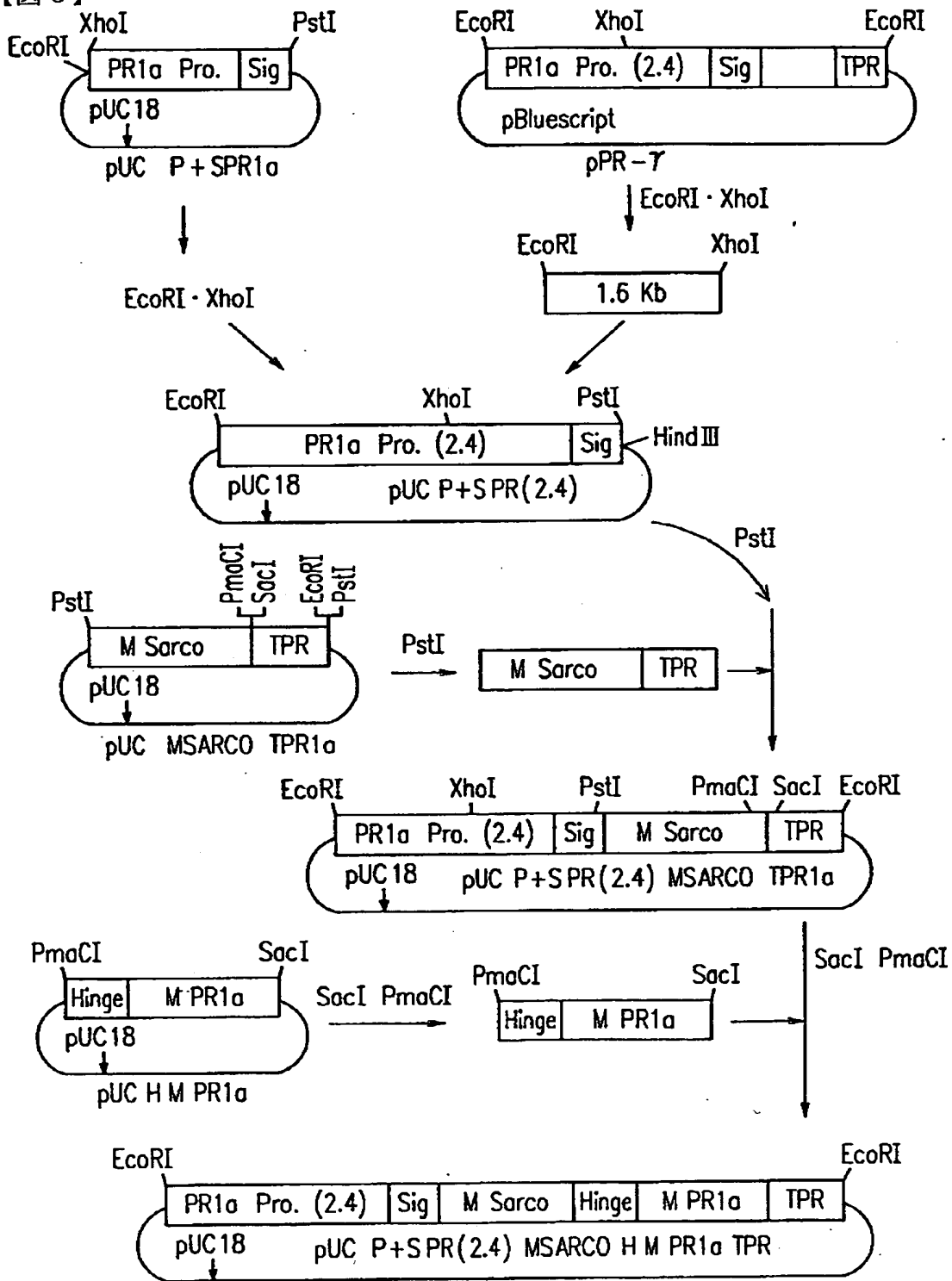
SacI



MSARCO31

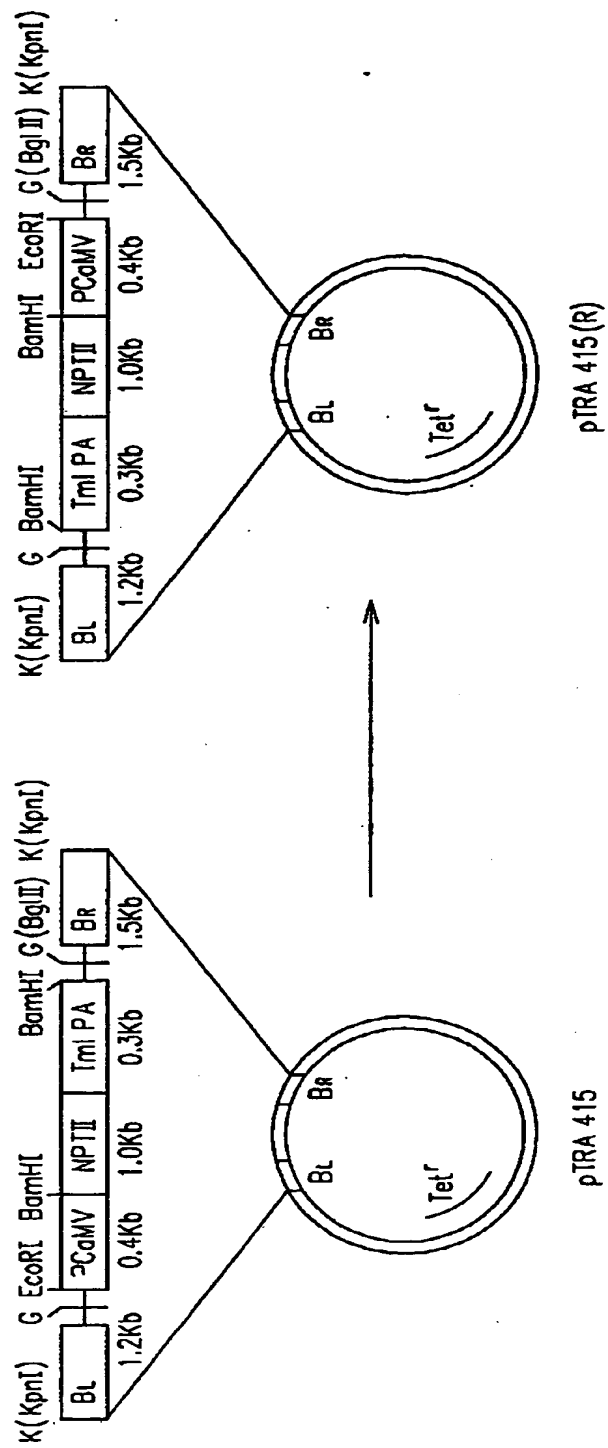


【図6】

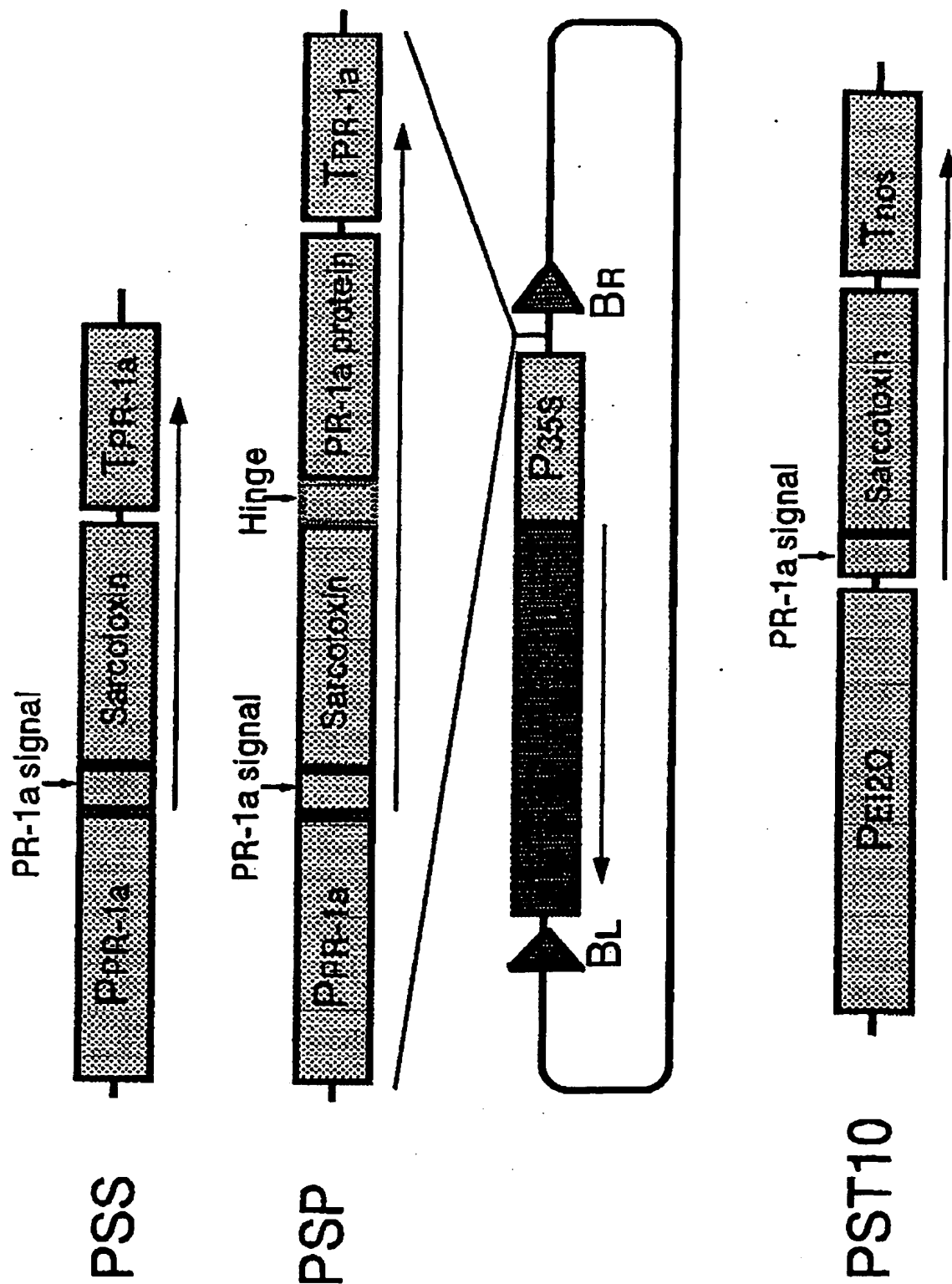


【図 7】

バイナリーベクター pTRA 415 の方向を変える



【図 8】



【図 9】

	A. 抗ザルコトキシン抗体	B. 抗PR1a抗体
導入遺伝子	形質転換個体 PSP      PST10      PSP ↓ 119 121 127 / 119 121 127	形質転換個体 PSP      PST10      PSP ↓ 119 121 127 / 119 121 127
SA 処理	- - - + + + +	- - - + + + +

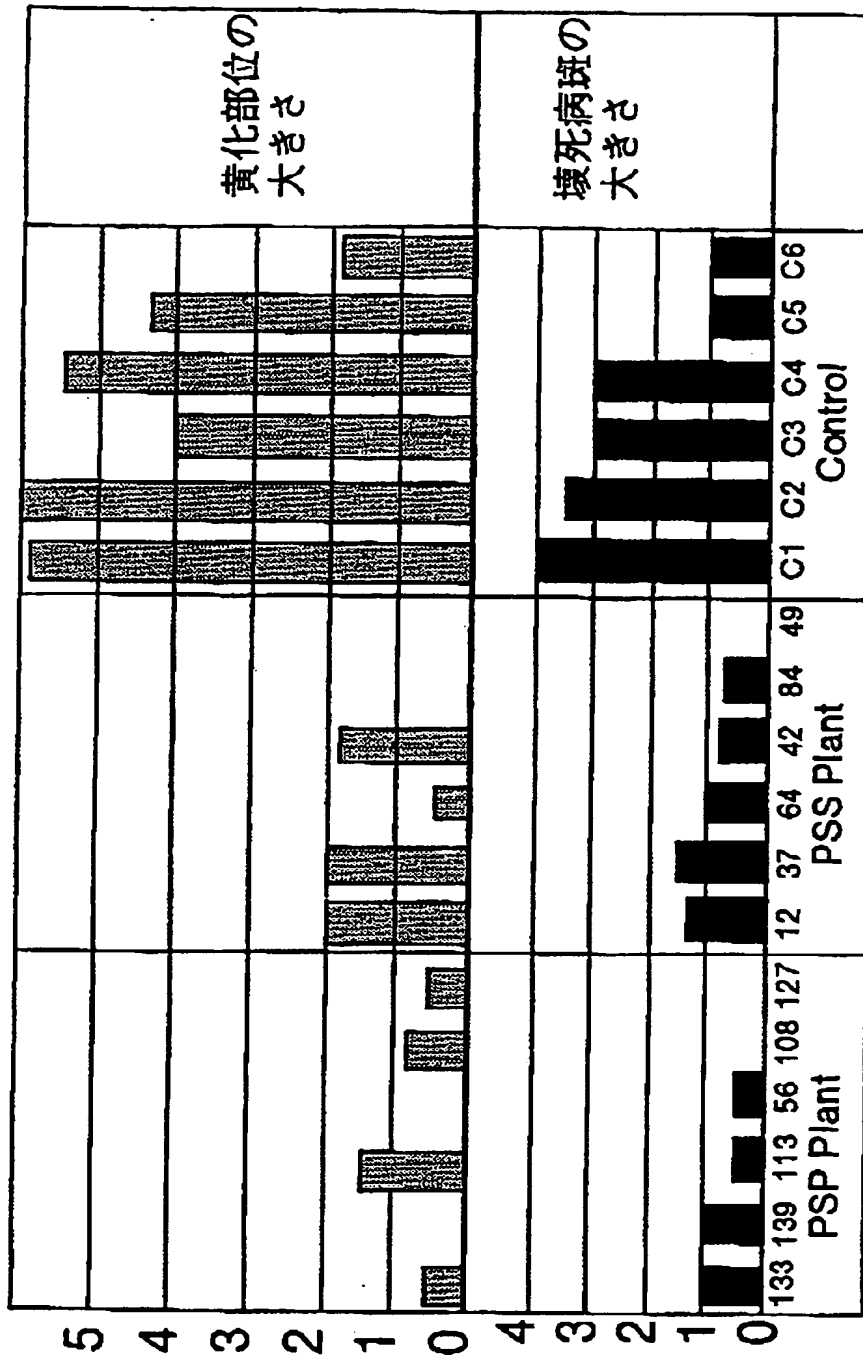
形質転換植物中で検出された導入遺伝子産物 (SDS-PAGE後のウェスタンブロッティング)

A: 抗ザルコトキシン抗体による検出

B: 抗PR1a抗体による検出

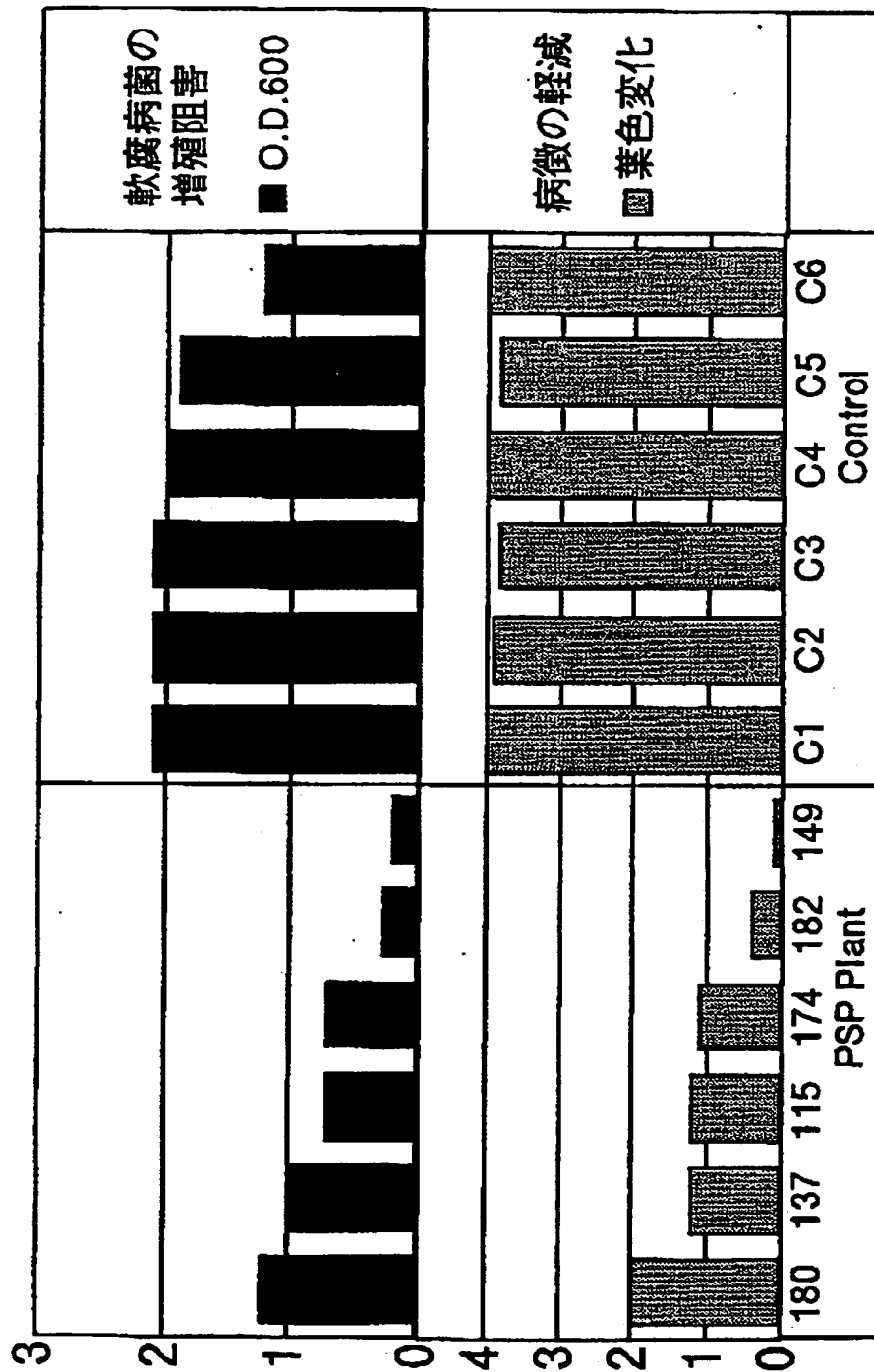
融合遺伝子を導入した植物(PSP)ではザルコトキシン-PR1a融合タンパク質及び遊離したザルコトキシンと思われるペプチドが検出される。またこれらの蓄積量はサリチル酸処理により増加する。

【図10】



# 形質転換植物の野火病菌に対する抵抗性

【図11】



形質転換植物における軟腐病菌抵抗性

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 病原菌に対して抵抗性のある植物を提供すること

【解決手段】 抗菌性ペプチドである sarcotoxin をコードする遺伝子とタバコ PR1a 遺伝子とをタバコキチナーゼの hinge 領域を介して結合させた発現カセットを植物に導入し、病原抵抗性植物を作成する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【手数料の表示】  
【納付金額】 0円  
【特許出願人】  
【識別番号】 591127076  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2  
【氏名又は名称】 農林水産省農業生物資源研究所長  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100078282  
【住所又は居所】 大阪市中央区城見1丁目2番27号 クリスタルタ  
ワー15階  
【氏名又は名称】 山本 秀策



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591127076]

1. 変更年月日	1991年 5月16日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台2丁目1の2
氏 名	農林水産省農業生物資源研究所長